

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ ХИТОЗАНА И
АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ L- И D-ФОРМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета

Чемодуровой Алины Александровны

Научный руководитель

Доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., доцент _____ О. Ю. Ксенофонтова

Научный консультант

к.б.н., старший научный сотрудник _____ И.В. Зудина

Зав. кафедрой микробиологии и

физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2016

Введение. У большинства лекарственных препаратов существует тесная взаимосвязь между пространственной структурой и фармакологической активностью, то есть наблюдается стереоспецифичность их действия. Stereoизомеры ряда лекарственных веществ могут различаться терапевтическим эффектом, и не всегда он оказывается благоприятным.

Аскорбиновая кислота (АК) существует в виде двух энантиомеров (L- и D-), которые, как было установлено, существенно различаются антиоксидантной и коллагенстимулирующей активностью. В связи с этим, препараты, содержащие АК в виде смеси стереоизомеров, будут существенно различаться своими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, что не может не отразиться на эффективности проводимого лечения. В связи с этим, целью настоящей работы явилось сравнение антибактериальной активности препаратов на основе солей хитозана и L- и D-изоформ аскорбиновой кислоты.

Для осуществления поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Сравнить *in vitro* антибактериальную активность гидрогелей на основе солей хитозана и L- и D-изоформ АК в отношении грамнегативных и грампозитивных бактериальных тест-культур.

2. Исследовать *in vivo* биоцидную активность солей хитозана и L- и D-изоформ АК в отношении пародонтопатогенных бактерий.

Объектом исследований явились гелеобразные 0,45%-ные растворы хитозана в L- и D-аскорбиновой кислоте (молярное соотношение ХТЗ:АК = 1:1).

Теоретической и методологической основой исследования выступают научные труды отечественных и зарубежных ученых-биологов и врачей, посвященные актуальной проблеме стереоизомеризма в фармакологии. В процессе работы были использованы такие приемы научного исследования как системный подход, статистические методы обработки информации.

Структура обусловлена целью, задачами, она включает введение, три главы (Обзор литературы, Материал и методы исследования и Результаты исследования), заключение и список использованных источников.

Основное содержание работы. При выполнении первой задачи об антибактериальной активности солей хитозана и L- и D-изоформ АК судили по изменению величины удельной скорости размножения (r , час⁻¹) культур, выращенных в бульоне МПБ совместно с тестируемыми препаратами в разных концентрациях. В результате проведенных серий измерений было установлено, что гидрогель на основе соли хитозана и D-изоформы АК оказывает значительно большее ингибирующее действие на культуры кишечной палочки и золотистого стафилококка, чем гидрогель на основе соли хитозана и L-изоформы АК. Так, удельная скорость роста *Staphylococcus aureus* 209 в МПБ достигает значения 0,005 час⁻¹ в присутствии соли хитозана и L-изоформы АК в концентрации 66,9 мг/мл, а соли хитозана и D-изоформы АК - в концентрации 8,4 мг/мл (таблица 1). Удельная скорость роста *Escherichia coli* 113-13 в значении 0,005 час⁻¹ отмечалась в МПБ с добавлением соли хитозана и L-изоформы АК в концентрации 267,5 мг/мл, а соли хитозана и D-изоформы АК – в концентрации 33,5 мг/мл.

Таблица 1 – Значения удельной скорости размножения (r , час⁻¹) культур *S. aureus* 209P и *E. coli* 113-13 в зависимости от концентрации добавленных в МПБ гидрогелей на основе солей хитозана и L- и D-изоформ АК

| Состав гидрогеля | Концентрация гидрогеля в МПБ, мг/мл | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 535,0 | 267,5 | 133,8 | 66,9 | 33,5 | 16,7 | 8,4 | 4,2 |
| <i>S. aureus</i> 209P | | | | | | | | |
| Хитозан+L-изоформа АК | 0,0015 | 0,0028 | 0,0034 | 0,0046 | 0,0055 | 0,0066 | 0,0087 | 0,0122 |
| Хитозан+D-изоформа АК | 0,0006 | 0,0008 | 0,0010 | 0,0016 | 0,0024 | 0,0035 | 0,0049 | 0,0073 |
| <i>E. coli</i> 113-13 | | | | | | | | |
| Хитозан+L-изоформа АК | 0,0033 | 0,0045 | 0,0057 | 0,0063 | 0,007 | 0,008 | 0,0089 | 0,0106 |
| Хитозан+D-изоформа АК | 0,0014 | 0,0018 | 0,0025 | 0,0036 | 0,0047 | 0,0065 | 0,0078 | 0,0094 |

Иммерсионная микроскопия мазков-препаратов позволила установить, что ингибирование роста бульонных культур в присутствии гидрогелей происходит, по всей видимости, за счет их деструктивного воздействия на структуры клеточной стенки (рисунок 1).

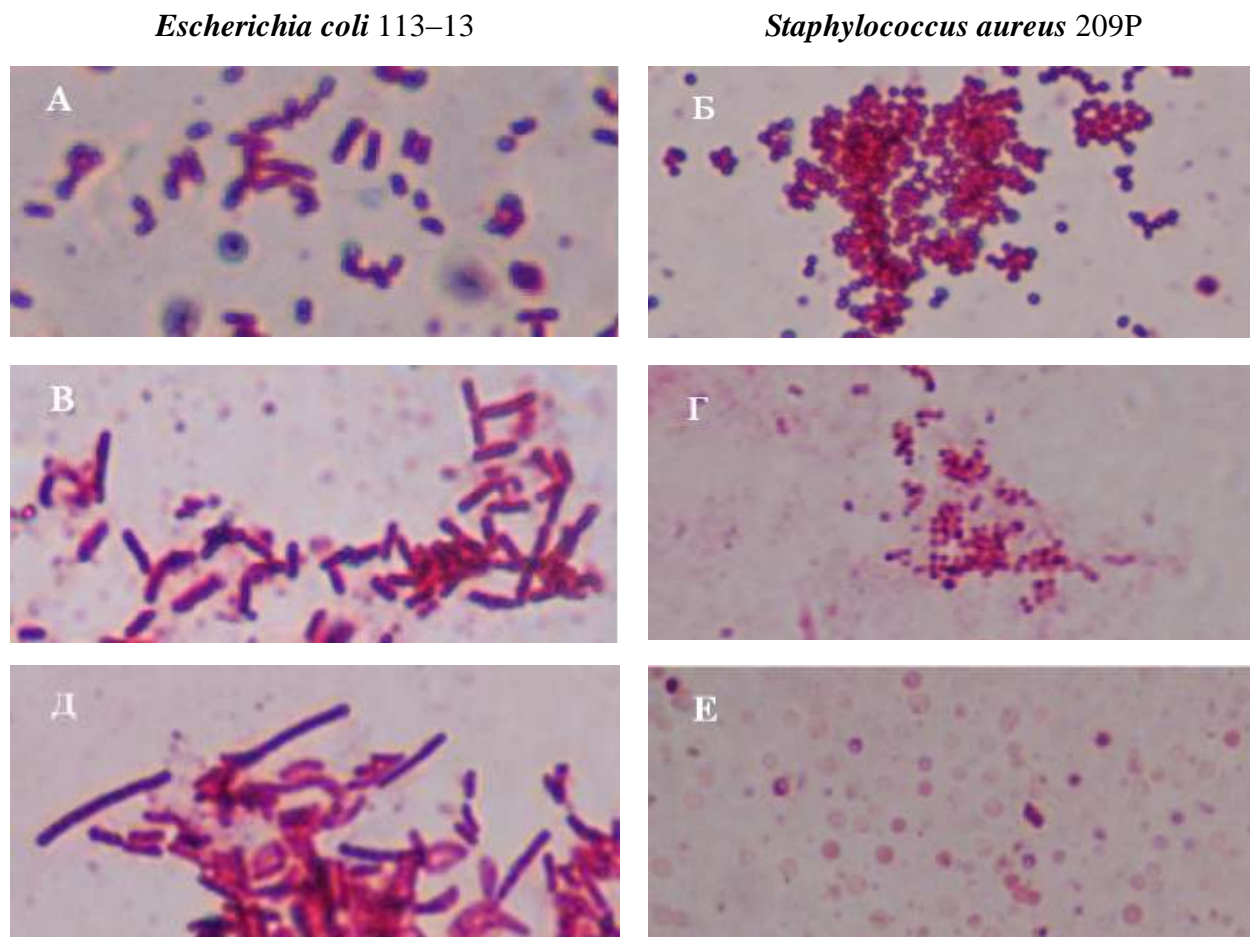


Рисунок 1 - Фотографии препаратов-мазков культур *Escherichia coli* 113-13 и *Staphylococcus aureus* 209P, выращенных в течение 4 часов в МПБ без (А, Б) и с добавлением гидрогелей на основе хитозана и L-изоформы (В, Г) или D-изоформы (Д, Е) аскорбиновой кислоты. Иммерсионная микроскопия, окраска карболовым фуксином, $\times 100$

В мазках культур *E. coli* 113-13, выращенных в присутствии гидрогелей на основе солей хитозана и L- и D-изоформ АК, отмечалось повышенное содержание удлинённых клеток с видимыми признаками нарушения клеточного деления (рисунок 1, В и Д). В мазках культуры золотистого стафилококка, выращенной в присутствии гидрогеля на основе соли хитозана и

L-изоформы АК, выявлялись редкие скопления агглютинированных мелких клеток (рисунок Г). В то же время в мазках культуры *S. aureus* 209P, выращенной в присутствии гидрогеля на основе соли хитозана и D-изоформы АК, целые живые клетки практически не обнаруживались (рисунок 1, Е).

Для выполнения второй задачи сначала требовалось оценить распространенность воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) среди молодых людей (до 25 лет) и идентифицировать у них ДНК пародонтопатогенов в десневой жидкости. При оценке состояния стоматологического статуса у 100 молодых людей было установлено, что распространенность воспалительных заболеваний пародонта среди обследованных составляет 23,0%. Хронический гингивит был диагностирован у 19 (19%) человек, а хронический генерализованный пародонтит легкой степени – у 4 (4%) человек.

ДНК пяти видов пародонтопатогенов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в десневой жидкости выявляли методом ПЦР с помощью набора «Мультидент-5» (ООО «НПФ Генлаб», г.Москва) (рисунок 2). Установлено, что у лиц со здоровым пародонтом, как и у больных ВЗП, в десневой жидкости с наибольшей частотой выявлялась ДНК *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia* (рисунок 3). Несмотря на то, что в группе людей со здоровым пародонтом (77 чел.) отмечался хороший уровень гигиены полости рта (ГИ - $0,83 \pm 0,09$; РМА – 0; I. Muhlemann - 0), тем не менее, у 18 (23,4%) человек была выявлена ДНК *P. gingivalis*; у 9 (11,7%) человек - ДНК *P. intermedia*; у 8 (10,3%) человек - ДНК *A. actinomycetemcomitans*; у 4 (5,2%) человек - ДНК *T. forsythia*; у 1 (5%) человека – ДНК *T. denticola*.

У 66,2% (51 чел.) здоровых молодых людей ДНК пародонтопатогенов не была выявлена; у 18,2% (14 чел.) лиц обнаруживалась ДНК только одного из пяти видов патогенных бактерий; у 13% (10 чел.) и 2,6% (2 чел.) - ДНК 2-х или 3-х видов пародонтопатогенов, соответственно.

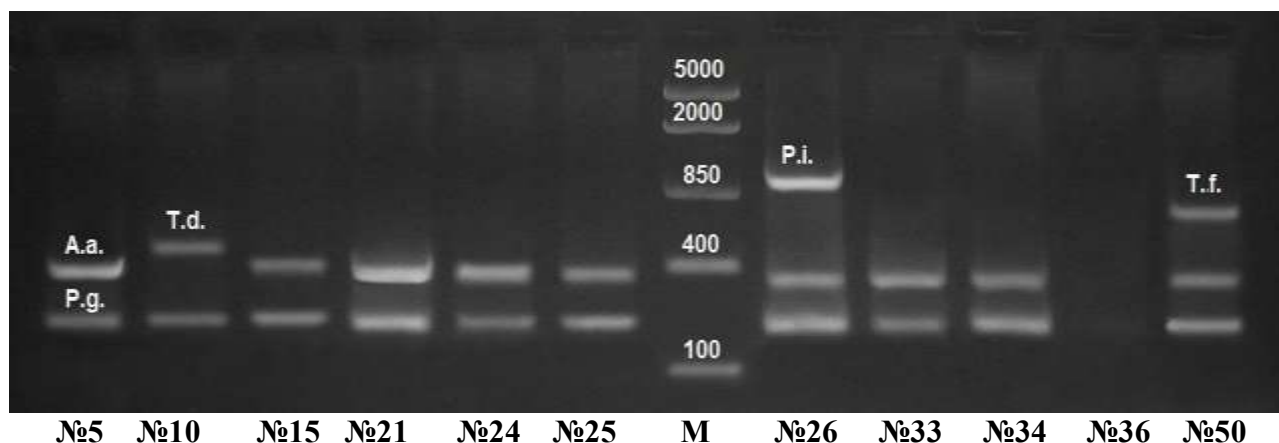


Рисунок 2 - Электрофореграмма продуктов ПЦР, амплифицированных в реакции с образцами десневой жидкости молодых лиц, страдающих ВЗП

Ампликоны соответствуют фрагментам ДНК:

- P.i. - *Prevotella intermedia*, (1000 п.н.);
- T.f. - *Tannerella forsythia*, (747 п.н.);
- T.d. - *Treponema denticola*, (512 п.н.);
- A.a. - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- P.g. - *Porphyromonas gingivalis*, (197 п.н.).

М – маркер молекулярной массы ДНК (FastRuler Middle Range DNA Ladder, 100-5000 bp).

Образцы:

- №5 – *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №10 – *P. gingivalis*, (197 п.н.); *T. denticola*, (512 п.н.);
- №15 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №21 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №24 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №25 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №26 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.); *P. intermedia*, (1000 п.н.);
- №33 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №34 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.);
- №36 – ДНК пяти пародонтопатогенных бактерий отсутствует;
- №50 - *P. gingivalis*, (197 п.н.); *A. actinomycetemcomitans*, (360 п.н.); *B. forsythus*, (747 п.н.).

У 26,1% (6 чел.) больных ВЗП выявлялась ДНК одного из тестируемых видов бактерий, а ассоциации из 2-х или 3-х видов пародонтопатогенов – у 43,5% (10 чел.) и у 8,7% (2 чел.) больных, соответственно (Рисунок 3.2.3). У 26,3% (5 чел.), страдающих ХГ, ДНК 5 исследуемых пародонтогенов не была обнаружена. В этих случаях воспаление тканей пародонта, по всей видимости, было спровоцировано агрессивным действием каких-либо других патогенных бактерий, либо явилось следствием наличия общесоматических заболеваний.

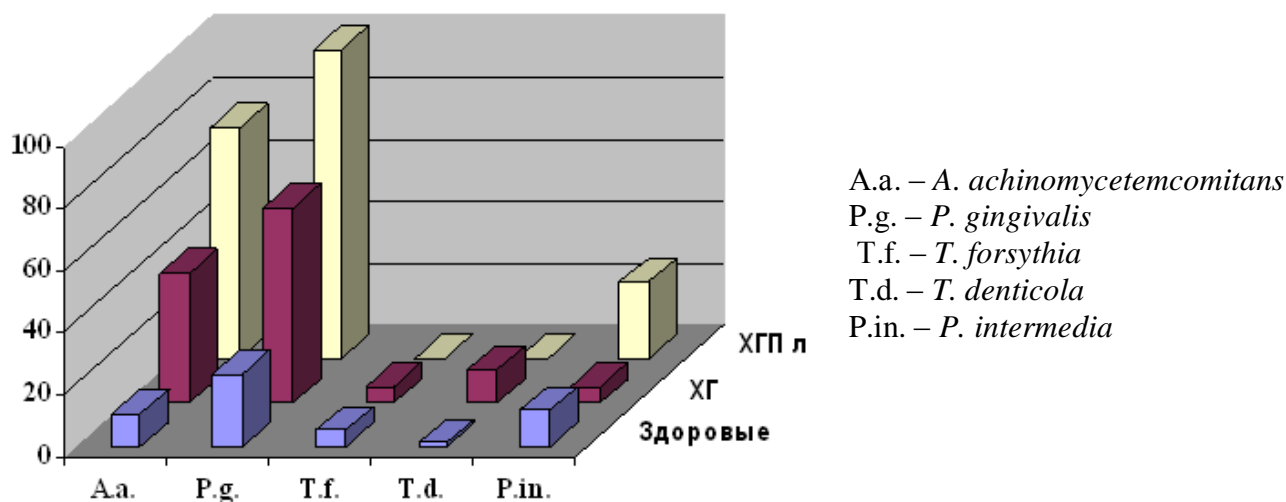


Рисунок 3 - Распределение случаев выявления ДНК пародонтопатогенов в десневой жидкости больных хроническим гингивитом (ХГ), хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени (ХГПл) и у здоровых лиц

Участники обследования, у которых были выявлены ДНК пародонтопатогенов и выраженные воспалительные изменения тканей пародонта, были разделены на две равноценные группы и им было предложено ежедневно в течение 7-ми дней после чистки зубов обрабатывать десну гидрогелями на основе солей хитозана и стереоизомеров АК. В процессе проведения терапии стало очевидным, что нормализация индексных стоматологических показателей у больных ВЗП, использовавших для аппликаций гидрогель на основе соли хитозана и L-изоформы АК, шла значительно медленнее. Противовоспалительная эффективность проведенных мероприятий в этой группе испытуемых составила 70,2%. В группе больных ВЗП, применявших гидрогель на основе соли хитозана и D-изоформы АК, этот показатель составлял 93,7%.

Достичь статистически значимое снижение частоты встречаемости ДНК удалось только в отношении *A. actinomycetemcomitans*. Снижение частоты встречаемости ДНК других четырех пародонтопатогенов, возможно, было обусловлено улучшением состояния гигиены полости рта в результате регулярной чистки зубов.

Заключение. В результате проведенных *in vitro* исследований удалось выявить различия в антимикробной активности гидрогелей на основе солей хитозана и стереоизомеров АК в отношении стандартных тест-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Ингибирование роста бульонных культур в присутствии гидрогелей происходит, по всей видимости, за счет их деструктивного воздействия на структуры клеточной стенки.

В то же время, при ежедневных (7 дней) аппликациях гидрогелей на краевую десну не удалось достичь полной санации полости рта от пародонтальных бактерий. В исследованиях *in vivo* установлено, что наибольшую чувствительность к гидрогелям на основе аскорбата хитозана проявляет грамотрицательная бактерия *A. Actinomycetemcomitans*. Таким образом, наблюдаемое в исследовании быстрое купирование воспаления тканей пародонта при аппликациях гидрогеля на основе соли хитозана и D-изоформы АК, по всей видимости, обусловлено не столько пролонгированной санацией полости рта, сколько иммуотропным действием хитозана на эффекторы врожденного иммунитета. Гидрогели на основе солей хитозана с хиральным органическим лигандом (D-изоформой аскорбиновой кислоты) могут рассматриваться в качестве перспективных антимикробных препаратов с иммунокорректирующими свойствами.

Выводы. 1. Установлено, что гидрогели на основе солей хитозана и стереоизомеров аскорбиновой кислоты (АК) в разной степени проявляют антимикробное действие в отношении бульонных культур стандартных тест-штаммов. Удельная скорость роста штаммов *S.aureus* 209P и *E.coli* 113-13 достигает значения $0,005 \text{ час}^{-1}$ при добавлении в МПБ гидрогеля с L-изоформой АК в концентрации в 8 раз ниже, чем гидрогеля с D-изоформой АК.

2. Иммерсионная микроскопия ($\times 100$) препаратов-мазков, окрашенных карболовым фуксином Циля, выявила деструктивное воздействие аскорбатов хитозана на структуры клеточной стенки, приводящее к нарушению процесса деления клеток *E. coli* 113-13 и к гибели клеток *Staphylococcus aureus* 209P.

3. Клинико-инструментальное обследование студентов-добровольцев (100 чел.) показало, что распространенность воспалительных заболеваний пародонта среди молодых людей в возрасте от 18 до 20 лет составляет 23,0%. Причем, у 19% был диагностирован хронический гингивит, у 4 % – хронический генерализованный пародонтит легкой степени.
4. В десневой жидкости здоровых лиц и больных ВЗП наиболее часто обнаруживалась ДНК *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *A. actinomycetemcomitans*. По мере углубления воспалительного процесса в тканях пародонтального комплекса возрастала доля случаев выявления ДНК нескольких пародонтопатогенов.
5. Ежедневные аппликации гидрогелей на основе солей хитозана и стереоизомеров аскорбиновой кислоты (АК) в область десневого края способствовало быстрому купированию воспалительных процессов в тканях пародонта и статистически значимому снижению частоты выделения ДНК *A. actinomycetemcomitans* из десневой жидкости.